

PCT/JP 03/12982

09.10.03

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

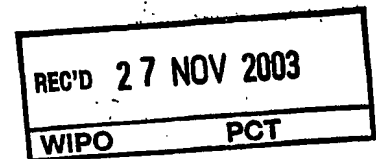
This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 2 年 1 1 月 2 0 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 2 - 3 3 7 2 1 2
Application Number:

[ST. 10/C] : [J P 2 0 0 2 - 3 3 7 2 1 2]

出 願 人 科学技術振興事業団
Applicant(s):



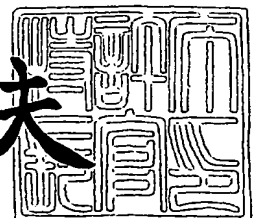
PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

Best Available Copy

2 0 0 3 年 1 1 月 1 4 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 NP02447-YS

【提出日】 平成14年11月20日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C07K 14/195

【発明の名称】 回転モーター分子 V 1 - A T P a s e

【請求項の数】 10

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市青葉区柿の木台 3 2 - 1 3
コーポカワハラ 2 0 3

【氏名】 今村 博臣

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県藤沢市片瀬海岸
9 - 1 3 - 1 1 0 3

【氏名】 吉田 賢右

【発明者】

【住所又は居所】 東京都町田市本町 1 1 6 5 - 2 B

【氏名】 横山 謙

【特許出願人】

【識別番号】 396020800

【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

【代理人】

【識別番号】 100093230

【弁理士】

【氏名又は名称】 西澤 利夫

【電話番号】 03-5454-7191

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 009911

【納付金額】 21,000円

1 -

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0013341

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 回転モーター分子V₁-ATPase

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 V₀V₁-ATPaseのV₁部分を構成するAサブユニット 3 個、Bサブユニット 3 個、Dサブユニット 1 個を有する複合体分子であって、ATP存在下で回転運動することを特徴とする回転モーター分子V₁-ATPase。

【請求項 2】 耐熱性を有する請求項 1 の回転モーター分子V₁-ATPase。

【請求項 3】 好熱菌Thermus thermophilus由来である請求項 2 の回転モーター分子V₁-ATPase。

【請求項 4】 Aサブユニットに相当する配列番号 3 のポリペプチド 3 個、Bサブユニットに相当する配列番号 4 のポリペプチド 3 個、Dサブユニットに相当する配列番号 5 のポリペプチド 1 個を有する複合体である請求項 3 の回転モーター分子V₁-ATPase。

【請求項 5】 配列番号 3 における第232番目Ser残基のAla残基への置換、および第235番目Thr残基のSer残基への置換の少なくとも一方を有する請求項 4 の回転モーター分子V₁-ATPase。

【請求項 6】 AサブユニットおよびBサブユニットの少なくとも一方が基板上に固定されている請求項 1 から 5 のいずれかの回転モーター分子V₁-ATPase。

【請求項 7】 AサブユニットのN端に結合したHisタグを介して基板上に固定されている請求項 6 の回転モーター分子V₁-ATPase。

【請求項 8】 Dサブユニットにジョイント部材が結合している請求項 1 から 7 のいずれかの回転モーター分子V₁-ATPase。

【請求項 9】 配列番号 5 における第48番目Glu残基を置換したCys残基、および第55番目Gln残基を置換したCys残基の少なくとも一方のCys残基にジョイント部材を結合している請求項 8 の回転モーター分子V₁-ATPase。

【請求項 10】 AサブユニットおよびBサブユニットにおける全てのCys残基が非Cys残基に置換されている請求項 9 の回転モーター分子V₁-ATPase。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

この出願の発明は、マイクロマシンやナノマシンの駆動部（ナノアクチュエータ）等として有用な新規回転モーター分子 V_1 -ATPaseに関するものである。

【0002】**【従来の技術】**

分子サイズの大きさを機械的な動きをするマイクロマシンやナノマシンの開発が注目されている。このようなマイクロマシンやナノマシンは、例えば、分子コンピュータの配線を加工する分子ロボットや体内で治療作業を行う医療用ロボットとして有望視されているからである。

【0003】

マイクロマシンやナノマシンを作成するためには、個々の要素デバイス（センサ、アクチュエータ、ミニチュア機械）や、それらの組立方法（マイクロマシニングやナノマシニング）に至るまで、様々な技術開発が必要とされている。特に、マイクロマシン駆動部であるマイクロアクチュエータやナノアクチュエータ（回転モーター）の開発は、マシンの自律運動にとって不可欠であり、様々な微細加工技術を利用したモーターデバイスの開発が進められている。しかしながら微細加工技術を応用した方法で作成できるマイクロアクチュエータは、小さいものでも $100\mu\text{m}$ 程度であり、マイクロマシンやナノマシンに装備するには、モーター装置の更なる微少化が求められている。

【0004】

そこで、微細加工技術によってモーターを構築するのではなく、回転運動能を有する単一分子をモーターとして利用することが提案されている。

【0005】

一般に、モーターとして利用できる分子は、外部エネルギーを回転運動に変換する動力機構があること、および1方向の回転を実現できることの2点を満たすことが求められている。そして、このような条件を満たす低分子有機化合物としては、例えば(3R,3'R)-(P,P)-trans-1,1',2,2',3,3',4,4'-octahydro-3,3'-dimethyl-4,4'-bipheanthrydiene（非特許文献1）とTriptycyl(4)helicene（非特許文献2）が知られている。前者は、炭素-炭素二重結合を挟んで左右対称的な形

を持っているが、立体的な込み合いのためねじれた構造となっている。これに適当な熱や光を加えると4つのプロセスを経て1方向に回転させることができる。また2回の光反応と熱異性化反応で1サイクルを完了し、1方向のみに進行する。すなわち、この有機化合物は、熱異性化反応と光反応とによって回転運動を行う。光反応による回転は非常に速い（ピコ秒レベル）が、熱異性化反応による回転には数分以上かかるため、実用化に適していない。また、駆動力が極めて弱いという問題点を有している。一方、後者はフォスゲン付加反応とウレタン結合形成、開裂という化学反応を利用して分子の一方向の回転を示す。しかしながら、この分子は繰り返し回転ができないという、アクチュエータとしての致命的な欠陥を有している。

【0006】

一方、マイクロマシンやナノマシン等に利用可能な単一分子モーターとしては、鞭毛モーター（非特許文献3、4）、ATP合成酵素（非特許文献5）、ミオシンモーター（非特許文献6、7）、微小管系モーター（非特許文献8）、核酸合成酵素の運動タンパク質（非特許文献9）等の生体分子も知られている。

【0007】

このうち、ATP合成酵素は、真核生物のミトコンドリア内膜、葉緑体のチラコイド膜、原核細胞膜などに普遍的に存在する膜タンパク質であり、細胞の消費するATPの大部分を合成している。ATP合成酵素（ F_0F_1 -ATP合成酵素）は分子量約50万にも及ぶ巨大膜タンパク質複合体であり、膜中に存在する F_0 部分と膜の外に存在する F_1 部分からなる。 F_0 部分は膜をプロトン（ H^+ ）が通過するために通り道になっており、 F_1 部分にはATPを合成/加水分解する触媒部位がある。 F_1 部分の分子量は約38万であり、例えばバクテリア由来のATP合成酵素における F_1 部分のサブユニット組成は $\alpha_3\beta_3\delta\gamma_1\varepsilon_1$ である。 α と β サブユニットはどちらにも似たようなATP結合部位を有するが、触媒活性は β サブユニットにある。両者は交互に並んでリングを形成しており、この $\alpha_3\beta_3$ リングの中心部に γ サブユニットが存在している。 δ サブユニットは $\alpha_3\beta_3$ リングの頂上に結合し、ATP加水分解活性を制御している。 ε サブユニットは γ サブユニットに結合している。一方、 F_0 部分は分子量約10万であり、そのアミノ酸組成は、プロトンの移動に必要なグルタミ

ン酸およびアスパラギン酸を多く含んでいる。サブユニット組成は $a_1b_2c_9-12$ であり、 c サブユニットは膜の中でリング状に配列し (c リング)、それに a サブユニットと、膜の外に長く突き出した腕を持つ b サブユニット 2 個が結合している。従って、 F_0F_1 -ATP合成酵素は、 F_1 部分と F_0 部分とが、 γ ϵ - c リング、 δ - b_2 の 2 箇所結合している。さらに特筆すべきは、この F_0F_1 -ATP合成酵素分子が 2 種類のトルク発生装置を備えている点である。一つは F_1 部分に存在するATP駆動型装置であり、他方は F_0 部分に存在するプロトン駆動型装置である。すなわち、 F_0 部分がプロトンを細胞膜内に取り込む場合には c リングが時計回りに回転し、プロトンを細胞膜外に排出する場合には c リングは反時計回りに回転する。一方、 F_1 部分は、ATP合成時にはその γ サブユニットが F_0 側からみた場合に時計回りに回転し、ATP分解時には反時計回りに回転する。そして、このような 2 種類のトルク発生装置を備えることによって、ATP合成酵素が生み出すトルクは数十ピコニュートン・nmであり、分子モーターとしての十分な駆動力を有している。また水系で作動するため体内でのアクチュエータとして最適であり、アクチンを十分に動かす力があるために生体内の蛋白質、糖質、脂質、核酸を操作することも可能である。

【0008】

そしてこの出願の発明者らは、この F_0F_1 -ATP合成酵素分子を改良して、広範な回転速度の制御が可能な改変型 F_0F_1 -ATP合成酵素分子とその利用発明を既に発明し、特許出願している (特願2002-148232: 出願日2002年5月22日)。また、最近になって、 F_1 -ATP合成酵素分子に亜鉛結合部位を導入し、亜鉛によって回転の開始・停止を制御することのできる回転モーター分子が報告されてもいる (非特許文献10)。

【0009】

【非特許文献1】

Nature 401:152-155, 1999

【非特許文献2】

Nature 401:150-152, 1999

【非特許文献3】

Microbiol. 6:1-18, 1967

【非特許文献 4】

Nature 245:380-382, 1973

【非特許文献 5】

Nature 386:299-302, 1997

【非特許文献 6】

Biochem. Biophys. Res. Comm. 199:1057-1063, 1994

【非特許文献 7】

Curr. Opin. Cell Biol. 7: 89-93, 1995

【非特許文献 8】

Cell 42:39-50, 1985

【非特許文献 9】

Nature 409: 113-119, 2001

【非特許文献10】

Nature Materials 1:173-177, 2002

【0 0 1 0】

【発明が解決しようとする課題】

前記のとおり、様々な回転モーター分子がマイクロマシンやナノマシン等の駆動部材として提案されており、回転の形態や回転数、トルク、回転の制御方法等においてそれぞれに特徴を有している。従って、実際にマイクロマシンやナノマシンを作成するためには、その用途やマシン構成に応じて多くの候補分子から適切なものを選択する必要がある。しかしながら、これまでに報告されている回転モーター分子のそれぞれは、マイクロマシンやナノマシンの他種多様な用途や構成の全てに対応可能であるとは言い難い。そのため、マイクロマシンやナノマシン等の開発に当たっては、回転モーター分子のラインナップを一つでも多く充実させることが望まれている。

【0 0 1 1】

従って、この出願は、従来の回転モーター分子とは特性の異なった新しい回転モーター分子を提供することを課題としている。

【0012】

また出願は、その回転運動をさらに円滑なものにするために、さらには回転運動の伝達手段等を分子に付加するために改良された新規回転モーター分子を提供することを課題としてもいる。

【0013】

【課題を解決するための手段】

この出願は、前記の課題を解決するための発明として、 V_0V_1 -ATPaseの V_1 部分を構成するAサブユニット3個、Bサブユニット3個、Dサブユニット1個を有する複合体分子であって、ATP存在下で回転運動することを特徴とする回転モーター分子 V_1 -ATPaseを提供する。

【0014】

この発明の V_1 -ATPaseは、触媒部位のAサブユニットを含み、AとBサブユニットは交互に配列し、 F_0F_1 -ATPaseの $\alpha_3\beta_3$ のように六量体の円筒を形成するものであって、Dサブユニットは A_3B_3 の円筒の中央の空洞を埋めており、Fサブユニットは、Dサブユニットに結合しており、DサブユニットとFサブユニットは、回転子（回転シャフト、回転軸）として働く。

【0015】

この発明の回転モーター分子 V_1 -ATPaseは、耐熱性分子であることを一つの態様としており、その場合に好熱菌 *Thermus thermophilus* 由来の分子であることを好ましい態様としている。

【0016】

さらにこの好熱菌 *Thermus thermophilus* 由来の回転モーター分子 V_1 -ATPaseは、Aサブユニットに相当する配列番号3のポリペプチド3個、Bサブユニットに相当する配列番号4のポリペプチド3個、Dサブユニットに相当する配列番号5のポリペプチド1個を有する複合体であることを一つの好ましい態様としている。

【0017】

さらにこの発明の回転モーター分子 V_1 -ATPaseは、配列番号3における第232番目Ser残基のAla残基への置換、および第235番目Thr残基のSer残基への置換の少なくとも一方を有する改変型分子であることを別の態様としている。

【0018】

この改変された V_1 -ATPaseは、触媒部位であるAサブユニットを改変することによりMgADP阻害が解消され、ATP加水分解活性が亢進する。すなわち野生型 V_1 -ATPaseはMgADP阻害によって回転が抑制される傾向にあるが、MgADP阻害が解消された変異型 V_1 -ATPaseは、効率よい回転運動を示す。

【0019】

またさらに、この発明の回転モーター分子 V_1 -ATPaseは、AサブユニットおよびBサブユニットの少なくとも一方が基板上に固定されている改変型分子であることを別の態様としている。そしてこの場合には、AサブユニットのN端に結合したHisタグを介して基板上に固定されていることを好ましい態様としている。

【0020】

この発明の回転モーター分子 V_1 -ATPaseはまた、Dサブユニットにジョイント部材が結合していることを別の態様としている。そしてこの場合には、配列番号5における第48番目Glu残基を置換したCys残基、および第55番目Gln残基を置換したCys残基の少なくとも一方のCys残基にジョイント部材を結合していること、さらにはAサブユニットおよびBサブユニットにおける全てのCys残基が非Cys残基に置換されていることをそれぞれ好ましい態様としている。

【0021】

すなわち、この発明の回転モーター分子 V_1 -ATPaseは、細菌や真核生物のオルガネラ（液胞、リソソーム、ゴルジ体、細胞膜、被覆小胞、分泌顆粒等）に存在するV型（液胞膜型）ATPase（ V_0V_1 -ATPase）の、 V_1 部分（Aサブユニット3個、Bサブユニット3個、Dサブユニット1個からなる複合体）である。従来、 F_0F_1 -ATP合成酵素が回転モーター分子として機能することは知られていたが、この V_0V_1 -ATPaseの V_1 部分（ V_1 -ATPase）が回転運動することは全く知られていなかった。この発明の V_1 -ATPaseは、Aサブユニット3個およびBサブユニット3個によって構成される「筒状体」の内側に位置するDサブユニットが回転シャフトとして機能することを初めて見出して完成されたものである。

【0022】

なお、 V_0V_1 -ATPaseの V_1 部分はDサブユニットにFサブユニット1個を結合して

いるが、この発明の V_1 -ATPaseはこのFサブユニットを結合した分子をも包含する。また、この発明の V_1 -ATPaseは野性型だけでなく、前記のと通りの各種変異体をも包含する。さらに、前記の非特許文献10に開示されているような亜鉛認識部位の導入変異体をも包含する。

【0023】

以下、発明の実施形態を示し、前記各発明について詳しく説明するが、この発明を実施するために使用する様々な技術は、特にその出典を明示した技術を除いては、公知の文献等に基づいて当業者であれば容易かつ確実に実施可能である。例えば、遺伝子工学および分子生物学的技術はSambrook and Maniatis, in Molecular Cloning-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989; Ausubel, F. M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, N.Y, 1995等の記載を参考にすることができる。

【0024】

【発明の実施の形態】

この発明の回転モーター分子 V_1 -ATPaseは、各種細菌や真核生物が産生する V_0V_1 -ATPaseの V_1 部分 (V_1 -ATPase) であり、この V_1 -ATPaseをコードするポリヌクレオチド (DNA断片、RNA断片。好ましくはcDNA断片。以下「 V_1 -ATPaseポリヌクレオチド」と記載することがある) を用いて遺伝子工学的に製造することができる。すなわち V_0V_1 -ATPaseをコードするポリヌクレオチド (cDNA断片) の配列は公知のデータベース (例えばGenBankデータベース: URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>等) において多数公開されており、これらの配列情報を利用したプローブハイブリダイゼーション法やPCR法によって既存のcDNAライブラリー等から容易に取得することができる。

【0025】

そして、この V_1 -ATPaseポリヌクレオチドを公知の遺伝子工学的方法で発現させることによって、Aサブユニット3個、Bサブユニット3個、Dサブユニット1個からなる複合体 V_1 -ATPaseを取得することができる。例えば、例えば、RNAポリメラーゼプロモーターを有する発現ベクターに V_1 -ATPaseポリヌクレオチドを組

換え、この組換えベクターをプロモーターに対応するRNAポリメラーゼを含むウサギ網状赤血球溶解物や小麦胚芽抽出物などのインビトロ翻訳系に添加すれば、回転能を有するV₁-ATPaseをインビトロで生産することができる。RNAポリメラーゼプロモーターとしては、T7、T3、SP6などが例示できる。これらのRNAポリメラーゼプロモーターを含むベクターとしては、pKA1、pCDM8、pT3/T7 18、pT7/3 19、pBluescript IIなどが例示できる。また、V₁-ATPaseポリヌクレオチドを適当な宿主ベクター系において発現させれば、回転モーター分子V₁-ATPaseを大腸菌、枯草菌等の原核細胞や、酵母、昆虫細胞、哺乳動物細胞、植物細胞等の真核細胞などで生産することができる。例えば、大腸菌などの微生物で発現させる場合には、微生物中で複製可能なオリジン、プロモーター、リボソーム結合部位、DNAクロニング部位、ターミネーター等を有する発現ベクターにポリヌクレオチドを組換えて発現ベクターを作成し、この発現ベクターで宿主細胞を形質転換し、この形質転換体を培養すれば、その培養物から目的のV₁-ATPase分子を大量生産することができる。大腸菌用発現ベクターとしては、pUC系、pBluescript I I、pET発現システム、pGEX発現システムなどが例示できる。さらに、ポリヌクレオチドを真核細胞で発現させる場合には、ポリヌクレオチドをプロモーター、スプライシング領域、ポリ(A)付加部位等を有する真核細胞用発現ベクターに挿入して組換えベクターを作製し、このベクターをトランスフェクトした真核細胞から目的のV₁-ATPase分子を得ることができる。発現ベクターとしては、pKA1、pCDM8、pSVK3、pMSG、pSVL、pBK-CMV、pBK-RSV、EBVベクター、pRS、pYES2などが例示できる。真核細胞としては、ヒト胎児腎臓細胞HEK293、サル腎臓細胞COS7、チャイニーズハムスター卵巣細胞CHOなどの哺乳動物培養細胞、あるいはヒト臓器から単離した初代培養細胞などが使用できる。出芽酵母、分裂酵母、カイコ細胞、アフリカツメガエル卵細胞なども使用できる。発現ベクターを細胞に導入するには、電気穿孔法、リン酸カルシウム法、リボソーム法、DEAEデキストラン法など公知の方法を用いることができる。形質転換細胞で発現させたV₁-ATPaseを単離精製するためには、公知の分離操作を組み合わせて行うことができる。例えば、尿素などの変性剤や界面活性剤による処理、超音波処理、酵素消化、塩析や溶媒沈殿法、透析、遠心分離、限外濾過、ゲル濾過、SDS-PAGE、等電点電気泳動、

イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィーなどが挙げられる。

【0026】

またこのこの発明の回転モーター分子 V_1 -ATPaseは、工業的な利用の観点から、耐熱性分子であることが好ましい。従って、65℃以上で生育するThermus属、Methanococcus属やSulfolobus属等の細菌由来の V_1 -ATPaseポリヌクレオチドを使用することが好ましい。さらに、70℃以上でも生育することができる好熱菌Thermus thermophilus由来の V_1 -ATPaseポリヌクレオチドを使用することが特に好ましい。このThermus thermophilus由来の V_1 -ATPaseポリヌクレオチドは配列番号1に示した塩基配列を有している。このThermus thermophilus由来の V_1 -ATPaseポリヌクレオチドは、配列番号2のアミノ酸配列からなるポリペプチド（Fサブユニット）、配列番号3のポリペプチド（Aサブユニット）、配列番号4のポリペプチド（Bサブユニット）および配列番号5のポリペプチド（Dサブユニットからなる複合体）をコードしている。従って、配列番号1の334-4196 nt配列を前記の遺伝子工学的的方法により発現させることにより、Aサブユニット3個、Bサブユニット3個およびDサブユニット1個からなる耐熱性 V_1 -ATPaseを得ることができる。また配列番号1の1-4196 nt配列を発現させることによって、DサブユニットにFサブユニット1個を結合した耐熱性 V_1 -ATPaseを得ることができる。

【0027】

この発明の回転モーター分子 V_1 -ATPaseのさらに別の好ましい態様は、配列番号3における第232番目Ser残基のAla残基への置換、および第235番目Thr残基のSer残基への置換の少なくとも一方、さらに好ましくはこれらの置換の両方を有する改変型分子（以下、両方の置換を有する分子を「TSSA変異体」と記載することがある）である。すなわち、真核細胞のV-ATPaseと異なり、T. thermophilus等の細菌由来の V_1 -ATPaseは触媒の代謝回転の間、いわゆるMgADP阻害によって反応が中断するという傾向を有しており（J Biol Chem 273, 20504-20510, 1998）、通常はATPを基質として加えてから5分以内このADP抑制を示し、約10分間でATP加水分解を停止する。そこでこの出願の発明者らは幾つかの変異体を作成してADP抑制の効果を検討した結果、前記のTSSA変異体が、ATPを基質として加えてから1

時間もATP活性を持続させることを見出した。

【0028】

この発明の回転モーター分子 V_1 -ATPaseのさらにまた別の好ましい態様は、AサブユニットまたはBサブユニットの少なくとも一方が基板上に固定されている改変型分子である。すなわち、この固定によって、Dサブユニットの回転を効率よく伝達することが可能となる。このようなAおよび／またはBサブユニットの基板への結合は、例えば共有結合を用いた各種の方法によって行うことができるが、好ましくは、AサブユニットのN端にHisタグ（ヘクタヒスチジン）を結合させ、このHisタグをNi-NTAスライドに結合する方法（Nature 386:299-302, 1997；FEBS Letters 470:244-248, 2000）を採用することができる。

【0029】

この発明の回転モーター分子 V_1 -ATPaseはまた、Dサブユニットにジョイント部材が結合していることを別の好ましい態様としている。この場合の「ジョイント部材」とは、 V_1 -ATPaseにおけるDサブユニットの回転運動を他の部材（例えば、ギアや運動機関のシャフト等）に伝達するための部材である。またこのジョイント部材は他の部材との連結用としてではなく、 V_1 -ATPaseの回転を観察するための「プローブ」、あるいは「プロペラ」としても利用することができる。このようなジョイント部材としては、例えば後記実施例に例示したようなビーズを複数個連結したもの（マイクロスフェア）や、あるいはアクチンフィラメント（Nature 386:299-302, 1997）等の微細繊維を利用することができる。そして、このようなジョイント部材は、DサブユニットのCys残基に、例えばマレイミド、ジスルフィド結合等によって結合することができる。ただし、配列番号5にアミノ酸配列を示したThermus thermophilus由来 V_1 -ATPaseのDサブユニットにはCys残基が存在しないため、適当な非Cys残基をCys残基に置換する必要がある。そこでこの発明は、配列番号5における第48番目Glu残基を置換したCys残基、および第55番目Gln残基を置換したCys残基の少なくとも一方（好ましくは両方）のCys残基にジョイント部材を結合していることを好ましい態様とする。また、Dサブユニット以外のCys残基（Aサブユニットの合計9個、Bサブユニットの合計3個）にジョイント部材が結合しないように、これらのCys残基を他の残基（例えばSer残基

)に置換することが好ましい。

【0030】

また、ジョイント部材はDサブユニットではなく、Dサブユニットに結合したFサブユニットに結合させることもできる。その場合には、例えば配列番号2のアミノ酸における第28番目Serおよび／または第35番目Ser残基をCys残基に置換し、これらのCys残基にジョイント部材を結合させればよい。

【0031】

なお、前記の各変異体V₁-ATPaseは、V₁-ATPaseポリヌクレオチドにおける所定のアミノ酸残基をコードするトリプレットを、ミューテーション・キット等を使用する方法、変異導入型のPCR法、ポリヌクレオチド合成法（例えば、Nucleic Acid Res. 25:3440-3444, 1997等）によって置換し、この変異型ポリヌクレオチドを遺伝子工学的的方法によって発現させることによって取得することができる。

【0032】

以下、実施例を示してこの出願の発明についてさらに詳細かつ具体的に説明するが、この出願の発明は以下の例によって限定されるものではない。

【0033】

【実施例】

1. 材料と方法

1-1. タンパク質の調製

T. thermophilus HB8由来V₁-ATPaseのA、B、D、Fの各サブユニットをコードするDNA配列をlacプロモーター支配下に保持しているプラスミッドpUCV1によって形質転換した大腸菌株BL21-CodonPlus-RP(Stragene)を用いてV₁-ATPaseを発現させた。なお、A、B、D、Fの各サブユニットをコードするDNA配列には以下の変異体作成のための改変を加えた（アミノ酸位置は配列番号2-5に対応する）。

I: V₁-ATPase(A-Hisg-tags/ Δ Cys/A-S232A/A-T235S/D-E48C/D-Q55C)

- (1) AサブユニットのN端にHisタグを結合 (A-Hisg-tags)
- (2) AおよびBサブユニットの全てのCys残基がSer残基に置換 (Δ Cys)
- (3) Aサブユニットの第232番目SerがAlaに置換 (A-S232A)
- (4) Aサブユニットの第235番目ThrがSerに置換 (A-T235S)

(5) Dサブユニットの第48番目GluがCysに置換 (D-E48C)

(6) Dサブユニットの第55番目GlnがCysに置換 (D-Q55C)

II: V₁-ATPase (A-Hisg-tags/ Δ Cys/A-S232A/A-T235S/F-S28C/F-S35C)

(1) AサブユニットのN端にHisタグを結合 (A-Hisg-tags)

(2) AおよびBサブユニットの全てのCys残基がSer残基に置換 (Δ Cys)

(3) Aサブユニットの第232番目SerがAlaに置換 (A-S232A)

(4) Aサブユニットの第235番目ThrがSerに置換 (A-T235S)

(7) Fサブユニットの第28番目SerがCysに置換 (S28C)

(8) Fサブユニットの第35番目SerがCysに置換 (S35C)

形質転換細胞を、0.3M NaClを含む20mM imidazole/HCl (pH8.0)に懸濁し、65℃で30分間熱処理をした後、熱に不安定なタンパク質を除き、Ni²⁺-affinity column (Amersham)に供して0.3M NaClを含む0.5M imidazole/HCl (pH8.0)で溶出した。緩衝液をかえ、限外濾過 (VIVA-Spin, VIVA science) し、RESOURCE Q columnに供した。V₁-ATPaseを含む部分をSuperdex 200 column (Amersham)にかけ、コンタミネーションしているタンパク質を除去した。精製されたV₁-ATPaseを2モル過剰の6-[N'-[2-(N-maleimido)ethyl]-N-piperazinylamido]hexyl D-biotinamide (biotin-PEAC₅-malaimide, Dojindo)でビオチン化した。25℃で15分間インキュベーションした後、タンパク質をPD-10 Column (Amersham)に供し、未反応試薬を除いた。DおよびFサブユニットのビオチン化は、streptavidin-alkaline phosphatase conjugate (Amersham)を用いて、ウエスタンブロッティングにより確認した (図2)。

1-2. 回転観察

5 μ lのフローセルを、2枚のカバースリップ (50nm厚のスペーサーを介在) から作成した。底のガラス表面はNi²⁺-nitrilotriacetic acidでコートし、ビオチン化したV₁-ATPase (0.1-1 μ M)を緩衝液 (50mM Tris-HCl, pH8.0, 100mM KCl, 5mM MgCl₂, and 0.5%(w/v)BSA)からなるA溶液中でフローセルに注入し、Hisタグをガラスに結合させてV₁-ATPaseを固定した。

【0034】

0.1%(w/v)のStreptavidinでコートしたビーズ($\phi=0.56\mu\text{m}$, Bangs Laboratories inc.)溶液をフローセルに満たし、未結合ビーズは洗浄除去して、biotin-streptavidine結合によってDまたはFサブユニットにビーズを結合した。

【0035】

V_1 -ATPase分子の回転は、所定濃度のATP中(0.2mg/ml creatine kinase と2.5 mM creatine phosphate ATP再生システム中)で、ビーズの回転を明視野顕微鏡(IX70, Olympus、倍率1000)を使用して観察した。また回転の状態はCCDカメラでビデオ記録した。なお、この V_1 -ATPaseの回転観察システムは、 F_1 -ATPaseの回転システム(Proc Natl Acad Sci U S A 98, 13649-54, 2001)と同様である。すなわち、回転はDまたはFサブユニットに結合したビーズにより、斜めに結合された形で観察された(図2)。

1-3. その他のアッセイ

タンパク質濃度はUV測定によって行った。ATP加水分解活性は、pyruvate kinaseとlactate dehydrogenaseとをカップリングさせたNADH酸化により測定した。

2. 結果

2-1. 回転の観察

V_1 -ATPase(A-His8-tags/ Δ Cys/A-S232A/A-T235S/ D-E48C/D-Q55C)および V_1 -ATPase(A-His8-tags/ Δ Cys/A-S232A/A-T235S/F-S28C/F-S35C)の2つの変異体について回転を観察した。2つの変異体は、同じようなMichaelis MentenタイプのKineticsを示し、 $K_m=0.3-0.5\text{mM}$, $V_{\text{max}}(\text{turnover rate})\sim 10\text{sec}^{-1}$ を示した。これらの数値は、野生型のF_oF₁-ATP合成酵素と同程度であった(J Biol Chem 273, 20504-1014, 1998)。

2-2. Dサブユニットの回転

ATPを含む緩衝液をフローセルに注入させる場合に、 V_1 -ATPaseのDサブユニットに結合したビーズの回転が観察された(図3A-3D)。一つのフローセルでは、5-10個の回転ビーズが観察された。

【0036】

回転は一方向であり、 F_1 -ATPaseの回転方向と同様に、細胞膜側からみると常

に反時計回りであった。ATPを含まない緩衝液中では、ブラウン運動との区別がつく一方向の回転は観察されなかった。

【 0 0 3 7 】

アジド(Azide)はF₁-ATPaseのATPase活性も回転も阻害するが (Nature 386, 299-302, 1997)、V₁-ATPaseのATPase活性は阻害していないことが知られている (J Biol Chem 265, 21946-50, 1990)。変異体V₁-ATPaseの回転についても同様であり、アジド(Azide)は4mM ATP存在下 (図 3 A、B) や0.1mM ATP存在下でのV₁-ATPaseの回転に影響を与えなかった。

【 0 0 3 8 】

4mM ATP存在下での平均回転数は、約2.6 rps (revolutions per sec : 回転数/秒) 以下であった。1 mM ATP存在下での平均回転数は約2.4 rps以下であった。1回転に3分子のATPが使用されると仮定すれば、回転速度は、バルクの酵素反応速度論 (~10 ATPsの加水分解/秒) から観察されるATP加水分解速度に良く一致している。また、0.5 mM ATPでは平均回転数は約2.2 rpsと低下している (図 3 C)

2-3. Fサブユニットの回転

Fサブユニットに結合したビーズ回転も観察された。4 mM ATP濃度の条件では、1~3個の回転ビーズが観察された (図 4)。回転方向も常に反時計回りであった。回転速度は、約2.5 rpsであり、Dサブユニットの回転速度と同程度であった。

【 0 0 3 9 】

【発明の効果】

以上詳しく説明したとおり、この出願の発明によって、新規の回転モーター分子としてのV₁-ATPaseが提供される。また、この回転モーター分子V₁-ATPaseのさらに実用的形態としての各種変異体V₁-ATPaseが提供される。これらは、マイクロマシンやナノマシン等の作成に大きく寄与する。

【 0 0 4 0 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Corporation

<120> A Rotary Motor molecule V1-ATPase

<130> NP02447-YS

<140>

<141>

<160> 5

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 4199

<212> DNA

<213> Thermus thermophilus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(318)

<220>

<221> CDS

<222> (334)..(2067)

<220>

<221> CDS

<222> (2081)..(3514)

<220>

<221> CDS

<222> (3528)..(4196)

<400> 1

gtg agg atg gcg gtg atc gcc gat ccc gag acc gcc cag ggg ttc cgg 48

Val Arg Met Ala Val Ile Ala Asp Pro Glu Thr Ala Gln Gly Phe Arg

1

5

10

15

ctc gcg ggc ctc gag ggc tac ggg gcc tct tcg gcg gag gag gcc caa 96

Leu Ala Gly Leu Glu Gly Tyr Gly Ala Ser Ser Ala Glu Glu Ala Gln

20

25

30

agc ctc ctg gaa acc ctc gtg gag cgg ggc ggc tac gcc ctg gtg gcc 144

Ser Leu Leu Glu Thr Leu Val Glu Arg Gly Gly Tyr Ala Leu Val Ala

35

40

45

gtg gac gag gcg ctc ctc ccc gac ccc gag cgg gcg gtg gag cgc ctc 192

Val Asp Glu Ala Leu Leu Pro Asp Pro Glu Arg Ala Val Glu Arg Leu

50

55

60

atg cgg ggc agg gac ctc ccc gtg ctc ctg ccc atc gcg ggg ctg aag 240

Met Arg Gly Arg Asp Leu Pro Val Leu Leu Pro Ile Ala Gly Leu Lys

65

70

75

80

gag gcc ttc cag ggg cac gac gtg gaa ggc tac atg cgg gag ctg gtg 288

Glu Ala Phe Gln Gly His Asp Val Glu Gly Tyr Met Arg Glu Leu Val

85

90

95

agg aag acc atc ggc ttt gac atc aag ctg tagaatggag ggacg atg atc 339

Arg Lys Thr Ile Gly Phe Asp Ile Lys Leu Met Ile

100

105

caa ggg gtg atc cag aag atc gcg ggc ccg gcg gtg atc gcc aag ggc 387

Gln Gly Val Ile Gln Lys Ile Ala Gly Pro Ala Val Ile Ala Lys Gly

110

115

120

atg ctc ggg gcc cgc atg tac gac atc tgc aag gtg ggc gaa gag ggc 435

Met Leu Gly Ala Arg Met Tyr Asp Ile Cys Lys Val Gly Glu Glu Gly

125

130

135

140

ctc gtg ggc gag atc atc cgc ctg gac ggg gac acg gcc ttc gtc cag 483

Leu Val Gly Glu Ile Ile Arg Leu Asp Gly Asp Thr Ala Phe Val Gln

145

150

155

gtc tac gag gac acc tcg ggc cta aag gtg ggg gag ccc gtg gtc tcc 531

Val Tyr Glu Asp Thr Ser Gly Leu Lys Val Gly Glu Pro Val Val Ser

160

165

170

acg ggg ctt ccc ttg gcg gtg gag ctc ggc ccc ggg atg ctg aac ggc 579

Thr Gly Leu Pro Leu Ala Val Glu Leu Gly Pro Gly Met Leu Asn Gly

175

180

185

atc tac gac ggc atc cag cgc ccc ctg gag cgc atc cgg gag aag acg 627

Ile Tyr Asp Gly Ile Gln Arg Pro Leu Glu Arg Ile Arg Glu Lys Thr

190

195

200

ggg atc tac atc acc cgg ggc gtg gtg gtc cac gcc ctg gac cgg gag 675
Gly Ile Tyr Ile Thr Arg Gly Val Val Val His Ala Leu Asp Arg Glu
205 210 215 220

aag aag tgg gcc tgg acg ccc atg gtc aag ccc ggg gac gag gtg cgg 723
Lys Lys Trp Ala Trp Thr Pro Met Val Lys Pro Gly Asp Glu Val Arg
225 230 235

ggg ggt atg gtc ctg ggc acg gtg ccc gag ttc ggc ttc acc cac aag 771
Gly Gly Met Val Leu Gly Thr Val Pro Glu Phe Gly Phe Thr His Lys
240 245 250

atc ctg gta ccc ccg gac gtg cgg ggc cgg gtc aag gag gtg aag ccc 819
Ile Leu Val Pro Pro Asp Val Arg Gly Arg Val Lys Glu Val Lys Pro
255 260 265

gcc ggg gag tac acc gtg gag gag ccg gtg gtg gtc ctc gag gac ggc 867
Ala Gly Glu Tyr Thr Val Glu Glu Pro Val Val Val Leu Glu Asp Gly
270 275 280

acc gag ctc aag atg tac cac acc tgg ccc gtt cgc cgg gcg agg ccc 915
Thr Glu Leu Lys Met Tyr His Thr Trp Pro Val Arg Arg Ala Arg Pro
285 290 295 300

gtg caa agg aag ctt gac ccc aac acc ccc ttc ctc acg ggg atg cgc 963
Val Gln Arg Lys Leu Asp Pro Asn Thr Pro Phe Leu Thr Gly Met Arg
305 310 315

atc ctg gac gtc ctc ttc ccc gtg gcc atg ggg ggc acc gcc gcc atc 1011
Ile Leu Asp Val Leu Phe Pro Val Ala Met Gly Gly Thr Ala Ala Ile

320

325

330

cct ggg ccc ttc ggc agc ggc aag acc gtg acc cag cag tcc ctg gcc 1059
Pro Gly Pro Phe Gly Ser Gly Lys Thr Val Thr Gln Gln Ser Leu Ala

335

340

345

aag tgg tcc aac gcc gac gtg gtg gtc tac gtg ggc tgc ggg gag cgg 1107
Lys Trp Ser Asn Ala Asp Val Val Val Tyr Val Gly Cys Gly Glu Arg

350

355

360

ggg aac gag atg acc gac gtg ctc gtg gag ttc ccc gag ctc acc gac 1155
Gly Asn Glu Met Thr Asp Val Leu Val Glu Phe Pro Glu Leu Thr Asp

365

370

375

380

ccc aag acg ggg ggg ccc ttg atg cac cgc acc gtc ctc atc gcc aac 1203
Pro Lys Thr Gly Gly Pro Leu Met His Arg Thr Val Leu Ile Ala Asn

385

390

395

acc tcc aac atg ccc gtg gcc gcc cgc gag gcc agc atc tac gtg ggc 1251
Thr Ser Asn Met Pro Val Ala Ala Arg Glu Ala Ser Ile Tyr Val Gly

400

405

410

gtg acc atc gcc gag tac ttc cgc gac cag ggc ttc tcc gtg gcc ctc 1299
Val Thr Ile Ala Glu Tyr Phe Arg Asp Gln Gly Phe Ser Val Ala Leu

415

420

425

atg gcc gac tcc acg agc cgc tgg gcc gag gct ttg cgc gag atc tct 1347

Met Ala Asp Ser Thr Ser Arg Trp Ala Glu Ala Leu Arg Glu Ile Ser
 430 435 440

agc cgc ctc gag gag atg ccc gcc gag gag ggc tac ccg ccc tac ctc 1395
 Ser Arg Leu Glu Glu Met Pro Ala Glu Glu Gly Tyr Pro Pro Tyr Leu
 445 450 455 460

gcc gcc agg ctc gcc gcc ttc tac gag cgg gcg ggc aag gtc atc acc 1443
 Ala Ala Arg Leu Ala Ala Phe Tyr Glu Arg Ala Gly Lys Val Ile Thr
 465 470 475

ctg ggc ggc gag gag ggg gcg gtg acc atc gtg ggg gcc gtc tcc ccg 1491
 Leu Gly Gly Glu Glu Gly Ala Val Thr Ile Val Gly Ala Val Ser Pro
 480 485 490

ccg ggc ggc gac atg tcc gag ccc gtg acc cag tcc acc ttg agg atc 1539
 Pro Gly Gly Asp Met Ser Glu Pro Val Thr Gln Ser Thr Leu Arg Ile
 495 500 505

gtg ggg gcc ttc tgg cgg ctt gac gcc tcc ctg gcc ttc cgc cgc cac 1587
 Val Gly Ala Phe Trp Arg Leu Asp Ala Ser Leu Ala Phe Arg Arg His
 510 515 520

ttc ccc gcc atc aac tgg aac ggc tcc tac agc ctc ttc acc tcc gcc 1635
 Phe Pro Ala Ile Asn Trp Asn Gly Ser Tyr Ser Leu Phe Thr Ser Ala
 525 530 535 540

ctt gac ccc tgg tac cgg gag aac gtg gcc gag gac tac ccc gag ctc 1683
 Leu Asp Pro Trp Tyr Arg Glu Asn Val Ala Glu Asp Tyr Pro Glu Leu

545 550 555
cgc gac gcc atc tcc gag ctt ttg cag cgg gag gcg ggc ctc cag gag 1731
Arg Asp Ala Ile Ser Glu Leu Leu Gln Arg Glu Ala Gly Leu Gln Glu
560 565 570
atc gtc cag ctc gtg ggg ccg gac gcc ctc cag gac gcc gag cgc ctc 1779
Ile Val Gln Leu Val Gly Pro Asp Ala Leu Gln Asp Ala Glu Arg Leu
575 580 585
gtc att gag gtg ggc cgg atc atc cgc gag gac ttc ctg cag cag aac 1827
Val Ile Glu Val Gly Arg Ile Ile Arg Glu Asp Phe Leu Gln Gln Asn
590 595 600
gcc tac cac gag gtg gac gcc tac tgc tcc atg aag aag gcc tac ggg 1875
Ala Tyr His Glu Val Asp Ala Tyr Cys Ser Met Lys Lys Ala Tyr Gly
605 610 615 620
atc atg aag atg atc ctc gcc ttc tac aag gag gcg gag gcg gcc atc 1923
Ile Met Lys Met Ile Leu Ala Phe Tyr Lys Glu Ala Glu Ala Ala Ile
625 630 635
aag cgg ggg gtt tcc ata gac gag atc ctg cag ctc ccc gtt ctg gag 1971
Lys Arg Gly Val Ser Ile Asp Glu Ile Leu Gln Leu Pro Val Leu Glu
640 645 650
cgc atc ggc cgc gcc cgc tac gtg agc gag gag gag ttc ccc gcc tac 2019
Arg Ile Gly Arg Ala Arg Tyr Val Ser Glu Glu Glu Phe Pro Ala Tyr
655 660 665

ttt gag gag gcc atg aag gag atc cag ggg gcc ttc aag gcc ctg gcc 2067
Phe Glu Glu Ala Met Lys Glu Ile Gln Gly Ala Phe Lys Ala Leu Ala

670

675

680

taaaggggga gag atg gac ctt ctg aag aag gag tac acg ggc atc acc 2116

Met Asp Leu Leu Lys Lys Glu Tyr Thr Gly Ile Thr

685

690

695

tac atc tcg ggg cct ctt ctc ttc gtg gag aac gcc aag gac ctg gcc 2164

Tyr Ile Ser Gly Pro Leu Leu Phe Val Glu Asn Ala Lys Asp Leu Ala

700

705

710

tac ggg gcc atc gtg gac atc aag gac ggc acg ggc cgg gtc cgc ggc 2212

Tyr Gly Ala Ile Val Asp Ile Lys Asp Gly Thr Gly Arg Val Arg Gly

715

720

725

ggc cag gtg att gag gtc tcc gag gag tac gcc gtc atc cag gtg ttt 2260

Gly Gln Val Ile Glu Val Ser Glu Glu Tyr Ala Val Ile Gln Val Phe

730

735

740

gag gaa acc act ggg ctg gac ctg gcc acg acc agc gtg agc ctg gtg 2308

Glu Glu Thr Thr Gly Leu Asp Leu Ala Thr Thr Ser Val Ser Leu Val

745

750

755

760

gag gac gtg gcc cgg ctt ggg gtc tcc aag gag atg ctg ggc cgc cgc 2356

Glu Asp Val Ala Arg Leu Gly Val Ser Lys Glu Met Leu Gly Arg Arg

765

770

775

ttc aac ggc atc ggc aag ccc ata gac ggc ctg ccg ccc atc acc ccg 2404

Phe Asn Gly Ile Gly Lys Pro Ile Asp Gly Leu Pro Pro Ile Thr Pro

780

785

790

gag aag cgg ctc ccc atc acc ggc ctt ccc tta aac ccc gtg gcc cgg 2452

Glu Lys Arg Leu Pro Ile Thr Gly Leu Pro Leu Asn Pro Val Ala Arg

795

800

805

agg aag ccg gag cag ttc atc cag acg ggc atc tcc acc att gac gtg 2500

Arg Lys Pro Glu Gln Phe Ile Gln Thr Gly Ile Ser Thr Ile Asp Val

810

815

820

atg aac acc ctg gtc cgg ggg cag aag ctt ccc atc ttc tcc ggc tcg 2548

Met Asn Thr Leu Val Arg Gly Gln Lys Leu Pro Ile Phe Ser Gly Ser

825

830

835

840

ggg ctt ccc gcc aac gag atc gcc gcc cag atc gcc cgc cag gcc acg 2596

Gly Leu Pro Ala Asn Glu Ile Ala Ala Gln Ile Ala Arg Gln Ala Thr

845

850

855

gtg cgc ccc gac ctc tcc ggg gag ggg gag aag gag gag ccc ttc gcc 2644

Val Arg Pro Asp Leu Ser Gly Glu Gly Glu Lys Glu Glu Pro Phe Ala

860

865

870

gtg gtc ttc gcc gcc atg ggg atc acg cag cgg gag ctc tcc tac ttc 2692

Val Val Phe Ala Ala Met Gly Ile Thr Gln Arg Glu Leu Ser Tyr Phe

875

880

885

atc cag gag ttt gag cgc acc ggg gcc ctg agc cgc tcc gtc ctc ttc 2740

Ile Gln Glu Phe Glu Arg Thr Gly Ala Leu Ser Arg Ser Val Leu Phe
 890 895 900

ctg aac aag gcg gac gac ccc acc att gag cgc atc ctc acc ccc cgc 2788
 Leu Asn Lys Ala Asp Asp Pro Thr Ile Glu Arg Ile Leu Thr Pro Arg
 905 910 915 920

atg gcc ctc acc gtg gcc gag tac ctg gcc ttt gag cac gac tac cac 2836
 Met Ala Leu Thr Val Ala Glu Tyr Leu Ala Phe Glu His Asp Tyr His
 925 930 935

gtc ctc gtc atc ctc acg gac atg acc aac tac tgc gag gcc ttg cgg 2884
 Val Leu Val Ile Leu Thr Asp Met Thr Asn Tyr Cys Glu Ala Leu Arg
 940 945 950

gag atc ggg gcc gcc cgc gag gag atc ccg ggc cgc cgc ggt tac ccc 2932
 Glu Ile Gly Ala Ala Arg Glu Glu Ile Pro Gly Arg Arg Gly Tyr Pro
 955 960 965

ggc tac atg tac acc gac ctg gcc acc atc tac gag cgc gcc ggg gtg 2980
 Gly Tyr Met Tyr Thr Asp Leu Ala Thr Ile Tyr Glu Arg Ala Gly Val
 970 975 980

gtg gag ggg aag aag ggg agc gtg acc cag atc ccc atc ctc tcc atg 3028
 Val Glu Gly Lys Lys Gly Ser Val Thr Gln Ile Pro Ile Leu Ser Met
 985 990 995 1000

ccc gac gac gac cgc acc cac ccc atc ccc gac ctc acg ggc tac atc 3076
 Pro Asp Asp Asp Arg Thr His Pro Ile Pro Asp Leu Thr Gly Tyr Ile

1005	1010	1015	
acc gag ggg cag atc cag ctc tcc cgg gag ctc cac cgc aag ggc atc			3124
Thr Glu Gly Gln Ile Gln Leu Ser Arg Glu Leu His Arg Lys Gly Ile			
1020	1025	1030	
tac ccg ccc att gac ccc ttg ccc tcc ctc tcc cgg ctc atg aac aac			3172
Tyr Pro Pro Ile Asp Pro Leu Pro Ser Leu Ser Arg Leu Met Asn Asn			
1035	1040	1045	
ggc gtg ggc aag ggc aag acc cgg gag gac cac aag cag gtc tcc gac			3220
Gly Val Gly Lys Gly Lys Thr Arg Glu Asp His Lys Gln Val Ser Asp			
1050	1055	1060	
cag ctc tac tcc gcc tac gcc aac ggg gtg gac atc cgg aag ctc gtg			3268
Gln Leu Tyr Ser Ala Tyr Ala Asn Gly Val Asp Ile Arg Lys Leu Val			
1065	1070	1075	1080
gcc atc atc ggc gag gac gcc ctc acg gag aac gac cgc cgt tac ctc			3316
Ala Ile Ile Gly Glu Asp Ala Leu Thr Glu Asn Asp Arg Arg Tyr Leu			
1085	1090	1095	
cag ttc gcc gac gcc ttt gaa cgg ttc ttc atc aac cag ggg cag cag			3364
Gln Phe Ala Asp Ala Phe Glu Arg Phe Phe Ile Asn Gln Gly Gln Gln			
1100	1105	1110	
aac cgc tcc att gag gag agc ctg cag atc gcc tgg gcc ctc ctc tcc			3412
Asn Arg Ser Ile Glu Glu Ser Leu Gln Ile Ala Trp Ala Leu Leu Ser			
1115	1120	1125	

atg ctg ccc cag ggc gag ctc aag cgc atc tcc aag gac cac atc ggc 3460
Met Leu Pro Gln Gly Glu Leu Lys Arg Ile Ser Lys Asp His Ile Gly

1130

1135

1140

aag tac tac ggc cag aag ctg gag gag atc tgg ggc gcg ccc cag gcc 3508
Lys Tyr Tyr Gly Gln Lys Leu Glu Glu Ile Trp Gly Ala Pro Gln Ala

1145

1150

1155

1160

ctg gac taagggaggg tag atg agc cag gtg agc ccc acc cgg atg aac 3557
Leu Asp Met Ser Gln Val Ser Pro Thr Arg Met Asn

1165

1170

ctt ctg cag agg cgg ggg cag ctc cgc ctg gcg cag aag ggg gtg gac 3605
Leu Leu Gln Arg Arg Gly Gln Leu Arg Leu Ala Gln Lys Gly Val Asp

1175

1180

1185

ctc ctc aag aag aag cgg gac gcc ctg gtg gcc gag ttc ttc ggc ctg 3653
Leu Leu Lys Lys Lys Arg Asp Ala Leu Val Ala Glu Phe Phe Gly Leu

1190

1195

1200

gtg cgg gag gcc atg gag gcc agg aag gcc ctg gac cag gcg gcc aag 3701
Val Arg Glu Ala Met Glu Ala Arg Lys Ala Leu Asp Gln Ala Ala Lys

1205

1210

1215

1220

gag gcc tac gcc gcc ctc ctc ctg gcc cag gcc ttt gac ggg ccg gag 3749
Glu Ala Tyr Ala Ala Leu Leu Leu Ala Gln Ala Phe Asp Gly Pro Glu

1225

1230

1235

gtg gtg gcg ggg gcg gcc ctt ggg gtc ccg ccc ctc gag ggg gtg gag 3797
Val Val Ala Gly Ala Ala Leu Gly Val Pro Pro Leu Glu Gly Val Glu
1240 1245 1250

gcg gag gtg gag aac gtc tgg ggg agc aag gtg ccg agg ctc aag gcc 3845
Ala Glu Val Glu Asn Val Trp Gly Ser Lys Val Pro Arg Leu Lys Ala
1255 1260 1265

acc ttc ccc gac ggg gcc ctc ctt tcc ccg gtg ggg acc ccg gcc tac 3893
Thr Phe Pro Asp Gly Ala Leu Leu Ser Pro Val Gly Thr Pro Ala Tyr
1270 1275 1280

acc ctc gag gcc agc cgg gcc ttc cgc cgc tac gcc gag gcc ctg atc 3941
Thr Leu Glu Ala Ser Arg Ala Phe Arg Arg Tyr Ala Glu Ala Leu Ile
1285 1290 1295 1300

cgg gtg gcc aac acc gag acc cgc ctg aag aag atc ggg gag gag atc 3989
Arg Val Ala Asn Thr Glu Thr Arg Leu Lys Lys Ile Gly Glu Glu Ile
1305 1310 1315

aag aag acc acg cgg cgg gtg aac gcc ctg gag cag gtg gtg atc ccg 4037
Lys Lys Thr Thr Arg Arg Val Asn Ala Leu Glu Gln Val Val Ile Pro
1320 1325 1330

ggg atc cgc gcc cag atc cgc ttc atc cag cag gtc ctg gag cag cgg 4085
Gly Ile Arg Ala Gln Ile Arg Phe Ile Gln Gln Val Leu Glu Gln Arg
1335 1340 1345

gaa cgg gag gac acc ttc cgc ctc aag cgc atc aag ggc aag att gag 4133

Glu Arg Glu Asp Thr Phe Arg Leu Lys Arg Ile Lys Gly Lys Ile Glu
 1350 1355 1360

gcc cgg gag gcc gag gag gag ggc ggc cgg ccc aac ccg cag gtg gag 4181
 Ala Arg Glu Ala Glu Glu Glu Gly Gly Arg Pro Asn Pro Gln Val Glu
 1365 1370 1375 1380

atc ggg gcg ggc ctt taa 4199
 Ile Gly Ala Gly Leu
 1385

<210> 2

<211> 106

<212> PRT

<213> Thermus thermophilus

<400> 2

Val Arg Met Ala Val Ile Ala Asp Pro Glu Thr Ala Gln Gly Phe Arg
 1 5 10 15
 Leu Ala Gly Leu Glu Gly Tyr Gly Ala Ser Ser Ala Glu Glu Ala Gln
 20 25 30
 Ser Leu Leu Glu Thr Leu Val Glu Arg Gly Gly Tyr Ala Leu Val Ala
 35 40 45
 Val Asp Glu Ala Leu Leu Pro Asp Pro Glu Arg Ala Val Glu Arg Leu
 50 55 60
 Met Arg Gly Arg Asp Leu Pro Val Leu Leu Pro Ile Ala Gly Leu Lys
 65 70 75 80
 Glu Ala Phe Gln Gly His Asp Val Glu Gly Tyr Met Arg Glu Leu Val

85 90 95
 Arg Lys Thr Ile Gly Phe Asp Ile Lys Leu
 100 105

<210> 3

<211> 578

<212> PRT

<213> *Thermus thermophilus*

<400> 3

Met Ile Gln Gly Val Ile Gln Lys Ile Ala Gly Pro Ala Val Ile Ala
 1 5 10 15
 Lys Gly Met Leu Gly Ala Arg Met Tyr Asp Ile Cys Lys Val Gly Glu
 20 25 30
 Glu Gly Leu Val Gly Glu Ile Ile Arg Leu Asp Gly Asp Thr Ala Phe
 35 40 45
 Val Gln Val Tyr Glu Asp Thr Ser Gly Leu Lys Val Gly Glu Pro Val
 50 55 60
 Val Ser Thr Gly Leu Pro Leu Ala Val Glu Leu Gly Pro Gly Met Leu
 65 70 75 80
 Asn Gly Ile Tyr Asp Gly Ile Gln Arg Pro Leu Glu Arg Ile Arg Glu
 85 90 95
 Lys Thr Gly Ile Tyr Ile Thr Arg Gly Val Val Val His Ala Leu Asp
 100 105 110
 Arg Glu Lys Lys Trp Ala Trp Thr Pro Met Val Lys Pro Gly Asp Glu
 115 120 125
 Val Arg Gly Gly Met Val Leu Gly Thr Val Pro Glu Phe Gly Phe Thr
 130 135 140

His Lys Ile Leu Val Pro Pro Asp Val Arg Gly Arg Val Lys Glu Val
 145 150 155 160
 Lys Pro Ala Gly Glu Tyr Thr Val Glu Glu Pro Val Val Val Leu Glu
 165 170 175
 Asp Gly Thr Glu Leu Lys Met Tyr His Thr Trp Pro Val Arg Arg Ala
 180 185 190
 Arg Pro Val Gln Arg Lys Leu Asp Pro Asn Thr Pro Phe Leu Thr Gly
 195 200 205
 Met Arg Ile Leu Asp Val Leu Phe Pro Val Ala Met Gly Gly Thr Ala
 210 215 220
 Ala Ile Pro Gly Pro Phe Gly Ser Gly Lys Thr Val Thr Gln Gln Ser
 225 230 235 240
 Leu Ala Lys Trp Ser Asn Ala Asp Val Val Val Tyr Val Gly Cys Gly
 245 250 255
 Glu Arg Gly Asn Glu Met Thr Asp Val Leu Val Glu Phe Pro Glu Leu
 260 265 270
 Thr Asp Pro Lys Thr Gly Gly Pro Leu Met His Arg Thr Val Leu Ile
 275 280 285
 Ala Asn Thr Ser Asn Met Pro Val Ala Ala Arg Glu Ala Ser Ile Tyr
 290 295 300
 Val Gly Val Thr Ile Ala Glu Tyr Phe Arg Asp Gln Gly Phe Ser Val
 305 310 315 320
 Ala Leu Met Ala Asp Ser Thr Ser Arg Trp Ala Glu Ala Leu Arg Glu
 325 330 335
 Ile Ser Ser Arg Leu Glu Glu Met Pro Ala Glu Glu Gly Tyr Pro Pro
 340 345 350
 Tyr Leu Ala Ala Arg Leu Ala Ala Phe Tyr Glu Arg Ala Gly Lys Val
 355 360 365
 Ile Thr Leu Gly Gly Glu Glu Gly Ala Val Thr Ile Val Gly Ala Val

370 375 380
Ser Pro Pro Gly Gly Asp Met Ser Glu Pro Val Thr Gln Ser Thr Leu
385 390 395 400
Arg Ile Val Gly Ala Phe Trp Arg Leu Asp Ala Ser Leu Ala Phe Arg
405 410 415
Arg His Phe Pro Ala Ile Asn Trp Asn Gly Ser Tyr Ser Leu Phe Thr
420 425 430
Ser Ala Leu Asp Pro Trp Tyr Arg Glu Asn Val Ala Glu Asp Tyr Pro
435 440 445
Glu Leu Arg Asp Ala Ile Ser Glu Leu Leu Gln Arg Glu Ala Gly Leu
450 455 460
Gln Glu Ile Val Gln Leu Val Gly Pro Asp Ala Leu Gln Asp Ala Glu
465 470 475 480
Arg Leu Val Ile Glu Val Gly Arg Ile Ile Arg Glu Asp Phe Leu Gln
485 490 495
Gln Asn Ala Tyr His Glu Val Asp Ala Tyr Cys Ser Met Lys Lys Ala
500 505 510
Tyr Gly Ile Met Lys Met Ile Leu Ala Phe Tyr Lys Glu Ala Glu Ala
515 520 525
Ala Ile Lys Arg Gly Val Ser Ile Asp Glu Ile Leu Gln Leu Pro Val
530 535 540
Leu Glu Arg Ile Gly Arg Ala Arg Tyr Val Ser Glu Glu Glu Phe Pro
545 550 555 560
Ala Tyr Phe Glu Glu Ala Met Lys Glu Ile Gln Gly Ala Phe Lys Ala
565 570 575
Leu Ala

<211> 478

<212> PRT

<213> *Thermus thermophilus*

<400> 4

Met Asp Leu Leu Lys Lys Glu Tyr Thr Gly Ile Thr Tyr Ile Ser Gly
1 5 10 15
Pro Leu Leu Phe Val Glu Asn Ala Lys Asp Leu Ala Tyr Gly Ala Ile
20 25 30
Val Asp Ile Lys Asp Gly Thr Gly Arg Val Arg Gly Gly Gln Val Ile
35 40 45
Glu Val Ser Glu Glu Tyr Ala Val Ile Gln Val Phe Glu Glu Thr Thr
50 55 60
Gly Leu Asp Leu Ala Thr Thr Ser Val Ser Leu Val Glu Asp Val Ala
65 70 75 80
Arg Leu Gly Val Ser Lys Glu Met Leu Gly Arg Arg Phe Asn Gly Ile
85 90 95
Gly Lys Pro Ile Asp Gly Leu Pro Pro Ile Thr Pro Glu Lys Arg Leu
100 105 110
Pro Ile Thr Gly Leu Pro Leu Asn Pro Val Ala Arg Arg Lys Pro Glu
115 120 125
Gln Phe Ile Gln Thr Gly Ile Ser Thr Ile Asp Val Met Asn Thr Leu
130 135 140
Val Arg Gly Gln Lys Leu Pro Ile Phe Ser Gly Ser Gly Leu Pro Ala
145 150 155 160
Asn Glu Ile Ala Ala Gln Ile Ala Arg Gln Ala Thr Val Arg Pro Asp
165 170 175
Leu Ser Gly Glu Gly Glu Lys Glu Glu Pro Phe Ala Val Val Phe Ala
180 185 190

Ala Met Gly Ile Thr Gln Arg Glu Leu Ser Tyr Phe Ile Gln Glu Phe
195 200 205

Glu Arg Thr Gly Ala Leu Ser Arg Ser Val Leu Phe Leu Asn Lys Ala
210 215 220

Asp Asp Pro Thr Ile Glu Arg Ile Leu Thr Pro Arg Met Ala Leu Thr
225 230 235 240

Val Ala Glu Tyr Leu Ala Phe Glu His Asp Tyr His Val Leu Val Ile
245 250 255

Leu Thr Asp Met Thr Asn Tyr Cys Glu Ala Leu Arg Glu Ile Gly Ala
260 265 270

Ala Arg Glu Glu Ile Pro Gly Arg Arg Gly Tyr Pro Gly Tyr Met Tyr
275 280 285

Thr Asp Leu Ala Thr Ile Tyr Glu Arg Ala Gly Val Val Glu Gly Lys
290 295 300

Lys Gly Ser Val Thr Gln Ile Pro Ile Leu Ser Met Pro Asp Asp Asp
305 310 315 320

Arg Thr His Pro Ile Pro Asp Leu Thr Gly Tyr Ile Thr Glu Gly Gln
325 330 335

Ile Gln Leu Ser Arg Glu Leu His Arg Lys Gly Ile Tyr Pro Pro Ile
340 345 350

Asp Pro Leu Pro Ser Leu Ser Arg Leu Met Asn Asn Gly Val Gly Lys
355 360 365

Gly Lys Thr Arg Glu Asp His Lys Gln Val Ser Asp Gln Leu Tyr Ser
370 375 380

Ala Tyr Ala Asn Gly Val Asp Ile Arg Lys Leu Val Ala Ile Ile Gly
385 390 395 400

Glu Asp Ala Leu Thr Glu Asn Asp Arg Arg Tyr Leu Gln Phe Ala Asp
405 410 415

Ala Phe Glu Arg Phe Phe Ile Asn Gln Gly Gln Gln Asn Arg Ser Ile

420 425 430
 Glu Glu Ser Leu Gln Ile Ala Trp Ala Leu Leu Ser Met Leu Pro Gln
 435 440 445
 Gly Glu Leu Lys Arg Ile Ser Lys Asp His Ile Gly Lys Tyr Tyr Gly
 450 455 460
 Gln Lys Leu Glu Glu Ile Trp Gly Ala Pro Gln Ala Leu Asp
 465 470 475

<210> 5

<211> 223

<212> PRT

<213> *Thermus thermophilus*

<400> 5

Met Ser Gln Val Ser Pro Thr Arg Met Asn Leu Leu Gln Arg Arg Gly
 1 5 10 15
 Gln Leu Arg Leu Ala Gln Lys Gly Val Asp Leu Leu Lys Lys Lys Arg
 20 25 30
 Asp Ala Leu Val Ala Glu Phe Phe Gly Leu Val Arg Glu Ala Met Glu
 35 40 45
 Ala Arg Lys Ala Leu Asp Gln Ala Ala Lys Glu Ala Tyr Ala Ala Leu
 50 55 60
 Leu Leu Ala Gln Ala Phe Asp Gly Pro Glu Val Val Ala Gly Ala Ala
 65 70 75 80
 Leu Gly Val Pro Pro Leu Glu Gly Val Glu Ala Glu Val Glu Asn Val
 85 90 95
 Trp Gly Ser Lys Val Pro Arg Leu Lys Ala Thr Phe Pro Asp Gly Ala
 100 105 110

Leu Leu Ser Pro Val Gly Thr Pro Ala Tyr Thr Leu Glu Ala Ser Arg
 115 120 125
 Ala Phe Arg Arg Tyr Ala Glu Ala Leu Ile Arg Val Ala Asn Thr Glu
 130 135 140
 Thr Arg Leu Lys Lys Ile Gly Glu Glu Ile Lys Lys Thr Thr Arg Arg
 145 150 155 160
 Val Asn Ala Leu Glu Gln Val Val Ile Pro Gly Ile Arg Ala Gln Ile
 165 170 175
 Arg Phe Ile Gln Gln Val Leu Glu Gln Arg Glu Arg Glu Asp Thr Phe
 180 185 190
 Arg Leu Lys Arg Ile Lys Gly Lys Ile Glu Ala Arg Glu Ala Glu Glu
 195 200 205
 Glu Gly Gly Arg Pro Asn Pro Gln Val Glu Ile Gly Ala Gly Leu
 210 215 220

【図面の簡単な説明】

【図 1】

V₁-ATPaseの回転観察の状態を示した模式図である。矢印は回転方向を示す。

【図 2】

DまたはFサブユニットのビオチン化を確認したウェスタンブロット分析の結果である。左側（レーン1-4）はCBB染色、右側（レーン5-8）はalkaline phosphatase-streptavidineコンジュゲート染色である。レーン1および5はDサブユニットがビオチン化されたV₁-ATPase、レーン2および6はビオチン化されたFサブユニットを持つV₁-ATPase、レーン3および7はビオチン化されていないV₁-ATPase、レーン4および8は分子量マーカーである。

【図 3】

Dサブユニットに固定したビーズ回転の経時変化を測定した結果である。Aは4 mM ATP、0.5 mM sodium azide存在下でのビーズの回転である。B-Dはsodium azi

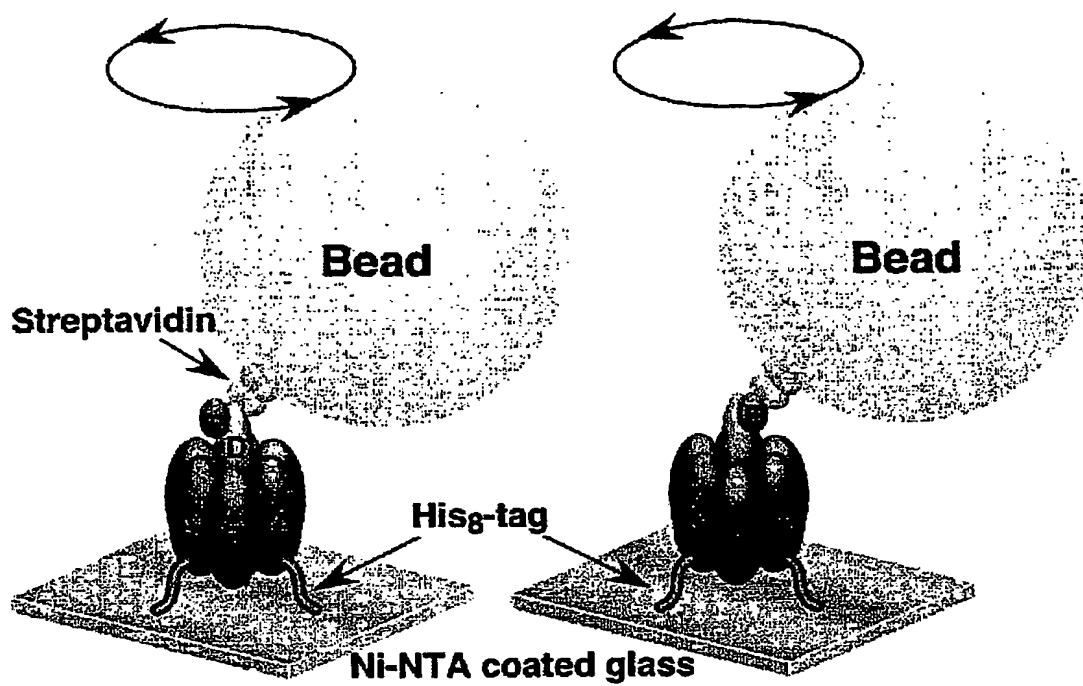
de非存在下で、Bは4 mM ATP、Cは0.5 mM ATP、Dは0.2 mM ATP溶液中でのビーズ回転の結果である。

【図 4】

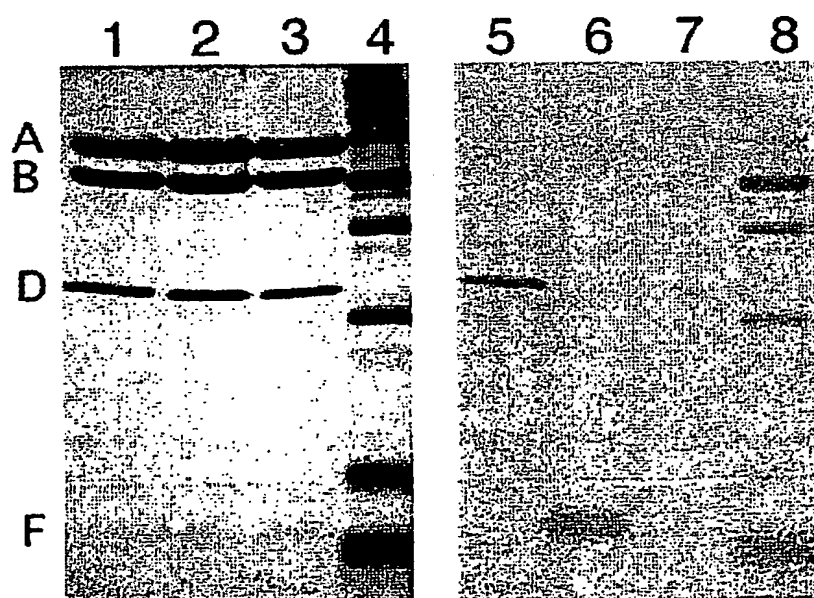
Fサブユニットに固定したビーズ回転の経時変化を、4 mM ATP溶液中で測定した結果である。

【書類名】 図面

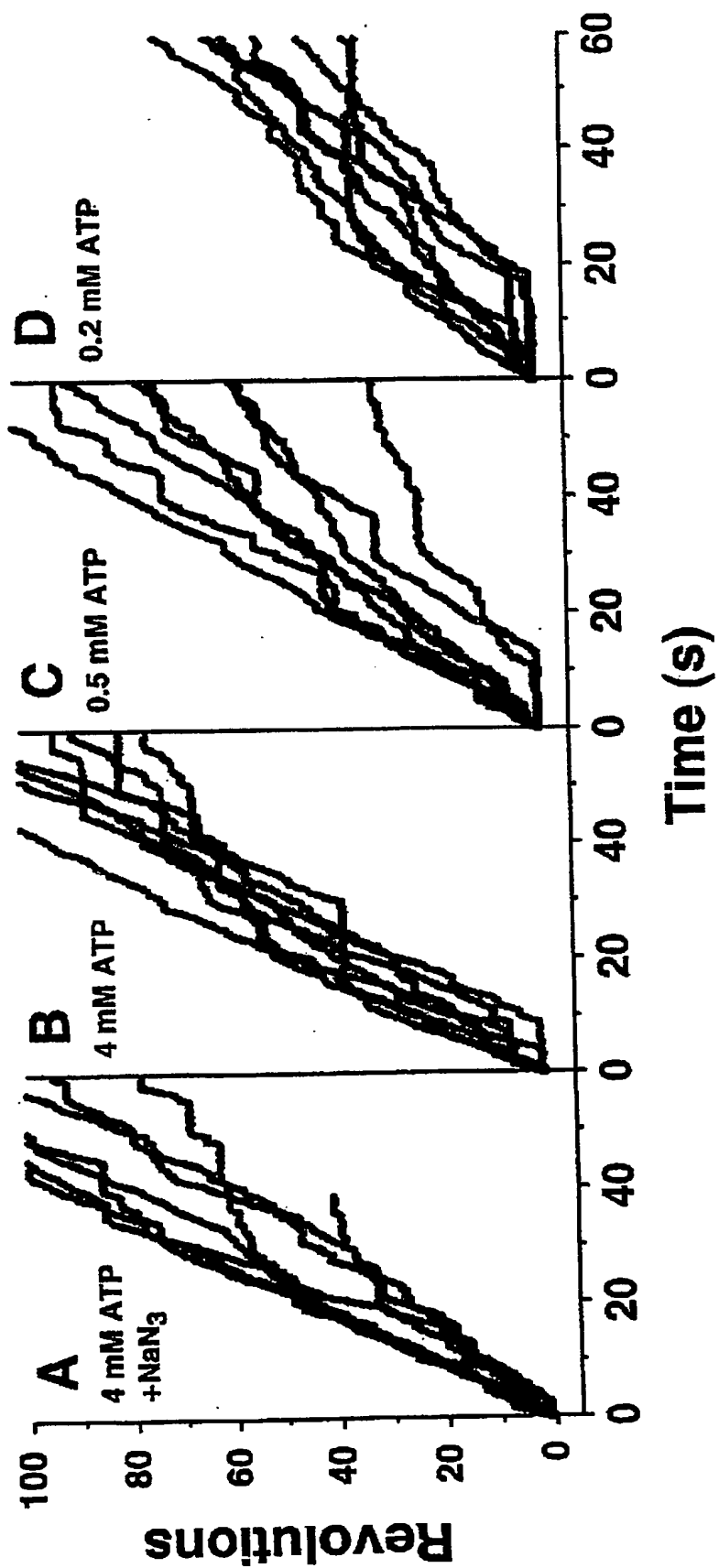
【図 1】



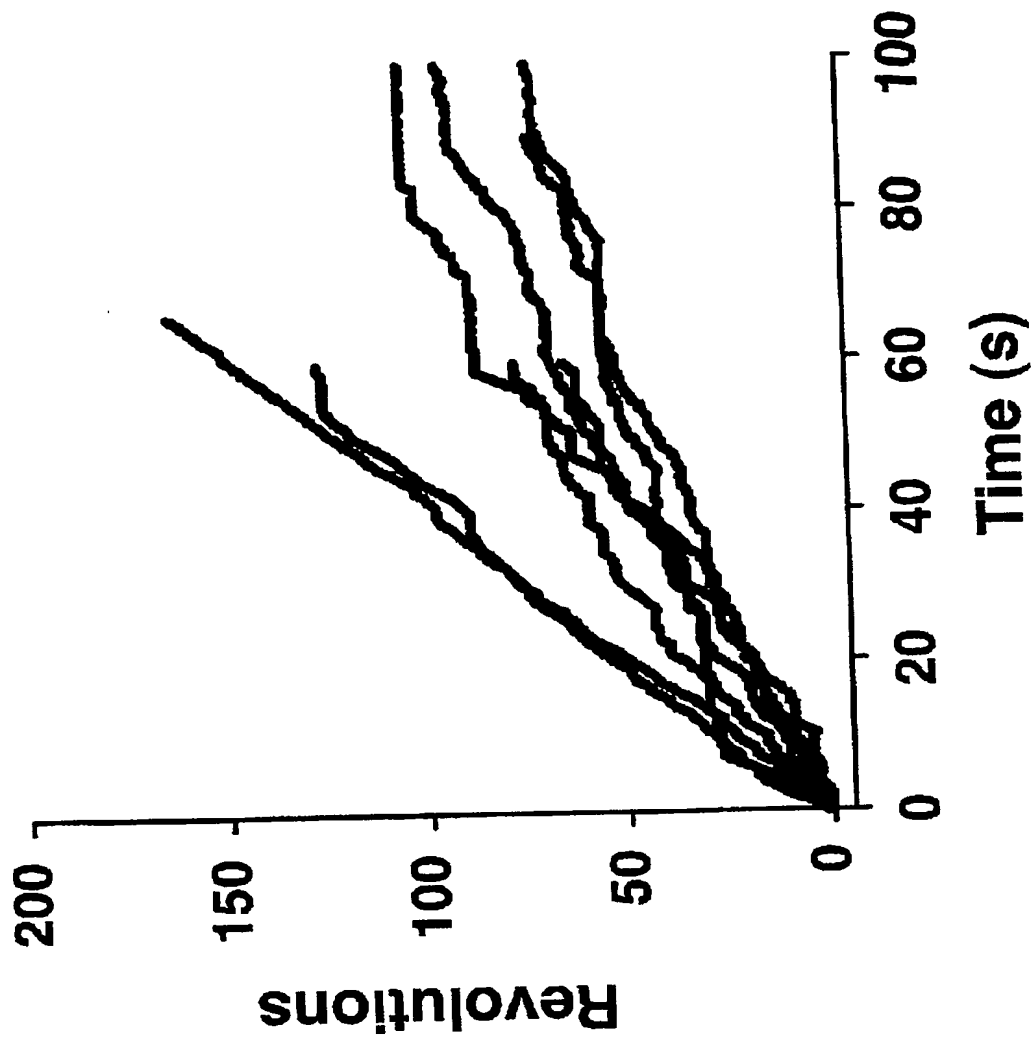
【図 2】



【図 3】



【図 4】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 従来の回転モーター分子とは特性の異なった新しい回転モーター分子を提供する。

【解決手段】 V_0V_1 -ATPaseの V_1 部分を構成するAサブユニット3個、Bサブユニット3個、Dサブユニット1個を有する複合体分子であって、ATP存在下で回転運動することを特徴とする回転モーター分子 V_1 -ATPase。

【選択図】 図1

特願 2002-337212

出願人履歴情報

識別番号

[396020800]

1. 変更年月日

1998年 2月24日

[変更理由]

名称変更

住 所

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

氏 名

科学技術振興事業団

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.